

УДК 602.3:579.8

**МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ  
НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА ДЛЯ БИОИНДИКАЦИИ  
БАКТЕРИЙ *VACILLUS MEGATERIUM***

Феоктистова Н. А., кандидат биологических наук, доцент\*

Лыдина М. А., кандидат биологических наук\*

Петрукова Н.А., аспирант\*

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор\*

Алешкин А.В., доктор биологических наук\*\*

Швиденко И.Г., доктор медицинских наук, профессор\*\*\*

\*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

г. Ульяновск, Российская Федерация

\*\*ФБУН «Московский научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского», г.

Москва, Российская Федерация

\*\*\*ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский  
университет им. В. И. Разумовского», г. Саратов, Российская  
Федерация

*Ключевые слова: Bacillus megaterium, бактериофаги, реакция нарастания титра фага, параметры, молоко, молокосодержащие продукты*

*В статье представлены результаты исследований по подбору параметров постановки реакции нарастания титра фага для разработки схемы ускоренной биоиндикации бактерий *Bacillus megaterium* в молочных и молокосодержащих продуктах, являющихся причиной их порчи. Результаты эксперимента свидетельствуют, что 28 часов – это оптимальный временной параметр постановки (РНФ) для детекции бактерий *Bacillus megaterium* с применением фага Вт–6 УГСХА.*

Общеизвестно, что при изготовлении сыров, сгущенных и сухих молочных консервов, происходит увеличение количества бактериальных клеток спорных микроорганизмов за счет их концентрации в виде удаления части влаги из сырья (молока). Так, для молочных и молокосодержащих продуктов, в рецептуре которых применяются разнообразные молочные и немолочные компоненты, а одной из стадий техноло-

гического процесса является высокотемпературная обработка, споровая микрофлора становится подавляющей [1].

Несмотря на вышесказанное, в настоящий момент влияние спорных аэробных микроорганизмов на качество и сроки хранения молочных и молокосодержащих продуктов считалось незначительным в связи с отсутствием в данных продуктах свободного кислорода и использования низкотемпературных режимов хранения. НИР, проводимые в отделе микробиологии ГНУ ВНИИМС Россельхозакадемии в последние годы, позволили установить, что споровые факультативно анаэробные микроорганизмы вида *Bacillus megaterium*, являются значимыми микроорганизмами порчи для молочных продуктов [2,3].

По литературным данным, бактерии вида *Bacillus megaterium* сложно поддаются идентификации на основе фенотипических и генетических особенностей. Поэтому создание фагового биопрепарата *Bacillus megaterium* и разработка параметров его применения для детекции вышеназванных бактерий – это актуальная задача, решение которой позволит частично снять вопрос об однозначной идентификации вышеназванного контаминанта молочных продуктов и разработать методы инаktivации данного микроорганизма, вызывающего порчу [4,5].

**Цель и задачи исследования.** Определить оптимальные параметры постановки реакции нарастания титра фага с экспериментальным биопрепаратом на основе фагов *Bacillus megaterium*.

Время экспозиции подбиралось из восьми следующих параметров:

- при предварительном подрачивании исследуемого материала в течение 7, 10, 16, 24 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 7 часов при температуре 37 °С;
- при увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 7, 10, 16, 24 часов при температуре 37 °С.

**Материалы и методы.** Штамм бактерий *Bacillus megaterium* 182 был получен из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Штамм бактериофага *Bacillus megaterium* - V.meg – 6 серии УГСХА выделен из пробы молока в 2013 году.

Объекты исследования – интактный мясоептонный бульон.

Для разработки схемы индикации бактерий использовали метод реакции нарастания титра фага (РНФ) по В.Я. Ганюшкину (1988) в модификации С.Н. Золотухина (2007) [6, 7, 8].

Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования, согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988). Реакция считалась

положительной, если количество негативных колоний фага, образовавшихся в контроле превышало количество негативных колоний фага, образовавшихся в эксперименте в 5 и более раз.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

**Результаты исследований.** Методика предварительного подрачивания исследуемого материала: брали четыре комплекта колб с МПБ (стерильный мясопептонный бульон) (по 50 мл) и контаминировали бактериями *Bacillus megaterium* в концентрации от  $10^1$  до  $10^5$  м.к./мл. Смеси в течение 10 минут встряхивали в шуттель-аппарате и ставили в термостат при температуре  $37^\circ\text{C}$ : первый комплект на 7 часов, второй комплект на 10 часов, третий комплект на 16, четвертый - 24 часа.

После культивирования в термостате содержимое колб разливали по пробиркам. На каждую исследуемую пробу брали 3 пробирки: № 1 для опытной пробы; № 2 для контроля на свободный фаг; № 3 для контроля титра индикаторного фага. Контроль титра индикаторного фага ставили один на группу анализов, проводимых одновременно. Исследуемый материал разливали по 9 мл в пробирки № 1 и № 2. Пробирка № 3 содержала 9 мл МПБ. В пробирки № 1 и № 3 добавляли по 1 мл индикаторного фага в рабочем разведении, содержащем  $10^4$  фаговых частиц в 1 мл. В пробирку № 2 вносили 1 мл МПБ. Пробирки встряхивали и ставили в термостат при температуре  $37^\circ\text{C}$  на 7 часов. По окончании инкубации из каждой пробирки брали по 0,25 мл материала и вносили в пробирки с 4,5 мл МПБ (для получения в контроле на индикаторный фаг сосчитываемого количества негативных колоний). Содержимое всех пробирок фильтровали через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type:  $0,22\ \mu\text{m GV}$ ) для очистки от бактериальных клеток и подвергали дальнейшему исследованию методом агаровых слоев по Грациа. Результаты учитывали через 18 часов.

Для чистоты эксперимента, мы исследовали объект исследований – контаминированный бактериями *Bacillus megaterium* МПБ - бактериологическим методом с целью выделения вышеназванных бактерий, часы культивирования в термостате аналогичны с методикой установления оптимального времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями) для сравнения с РНФ. В результате проведенных исследований получили следующие результаты: бактерии *Bacillus megaterium* обнаруживались в концентрации  $10^2$  м.к./мл, при этом на эксперимент затрачивалось более 100 часов.

Опытным путем было установлено, что подращивание материала в течение 7 часов не позволяет обнаружить бактерий *Bacillus megaterium* методом постановки РНФ в концентрации  $10^2$  м.к./мл для специфических фагов В. meg – 6 серии УГСХА. При подращивании исследуемого материала в течение 10, 16, 24 часов чувствительность реакции повышается и становится возможным провести детекцию бактерий *Bacillus megaterium* в количестве  $10^2$  м.к./мл. На проведение исследования затрачивается 40 часов. Бактериологическим методом аналогичное количество бактерий *Bacillus megaterium* удалось обнаружить через 24 часа подращивания материала, но на постановку реакции было затрачено 96 часов.

Во втором варианте опыта, МПБ, контаминированный бактериями *Bacillus megaterium* в концентрациях от  $10^1$  до  $10^5$  м.к./мл, не подращивали, а сразу же после встряхивания колб в шуттель-аппарате вносили в пробирки. Для каждого опыта использовали по четыре комплекта из 3 пробирок. В пробирки № 1 и № 2 вносили исследуемый материал из колб в количестве 9 мл. В пробирку № 3 вносили 9 мл стерильного МПБ. Затем в пробирки № 1 и № 3 добавляли по 1 мл индикаторного фага в концентрации  $10^4$  фаговых корпускул в миллилитре, в пробирку № 2 вносили 1 мл стерильного МПБ и помещали в термостат при температуре 37 °С: первый комплект на 7 часов, второй – на 10 часов, третий – на 16 часов, четвертый – на 24 часа.

По завершению инкубации из каждой пробирки брали по 0,25 мл материала и вносили в пробирку с 4,5 мл МПБ (для получения в контроле на индикаторный фаг сосчитываемого количества негативных колоний). Содержимое всех пробирок фильтровали через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22  $\mu$ m GV) и подвергали дальнейшему исследованию методом агаровых слоев по Грациа. Через 18 часов учитывали результаты.

По результатам изучения чувствительности РНФ в зависимости от времени культивирования исследуемого материала с фагом установлено, что культивирование исследуемого материала только в течение 10 часов позволяет обнаружить бактерии *Bacillus megaterium* методом РНФ в концентрации  $10^2$  м.к./мл для фага Вm–6 УГСХА. При инкубировании исследуемого материала с фагом в течение 16 и 24 часов чувствительность реакции не повышается, а при 7 часовом культивировании результаты переменные.

Эксперимент свидетельствует, что 28 часов – это оптимальный временной параметр постановки (РНФ) для детекции бактерий *Bacillus*

*megaterium* с применением фага Вм-6 УГСХА: 0,5 часа – подготовка реакции + 10 часов – время экспозиции субстрата с фагом + 0,5 часа – время, затрачиваемое на постановку эксперимента + 18 часов – время термостатирования посевов).

В результате проведенных исследований были выполнены поставленные задачи. Доказана возможность применения реакции нарастания титра фага для детекции бактерий *Bacillus megaterium* в молоке-сырье, молочных и молокосодержащих продуктах. Данная методика позволит сократить время идентификации источников порчи молока - бактерий *Bacillus megaterium*, уменьшить расход питательных сред и лабораторной посуды при исследовании, и, как следствие, повысить прибыль молокоперерабатывающих комбинатов за счет снижения выпуска бракеражной продукции.

### Библиографический список:

1. Свириденко, Г. Споровые аэробы рода *Bacillus* - значимые микроорганизмы порчи для молочных продуктов / Г. Свириденко, Т. Комарова - Продовольственный торгово-промышленный портал - режим доступа - <http://www.produkt.by/Journal>.
2. Васильев, Д.А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев [и др.]. - Ульяновск, ООО «Колор-Принт», 2013. – С. 48.
3. Васильев Д.А. Методы частной бактериологии / Д.А. Васильев, А.А. Щербаков, С.Н. Золотухин [и др.]. – Ульяновск, УГСХА, 2004. – С. 9-16.
4. Васильев, Д.А. Бактериофаги микроорганизмов, значимых для животных, растений и человека / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев [и др.]. - Ульяновск, ООО «Колор-Принт», 2013. – С. 186-226.
5. Васильев, Д.А. Бактериофаги рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин [и др.]. - Ульяновск, ООО «Колор-Принт», 2013. – С.16-21.
6. Феоктистова, Н.А. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / Н.А. Феоктистова, А.И. Мустафин, Д.А. Васильев [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 3 (15). – С.61-68.

7. Феоктистова, Н.А. Биоиндикация бактерий *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 3 (23). – С.43–49.

8. Юдина, М.А. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. – № 3 (19). – С.69–73.

**TECHNIQUE OF STATEMENT OF REACTION OF INCREASE  
OF THE CAPTION OF THE PHAGE FOR BIOINDICATION  
OF BACTERIA OF *BACILLUS MEGATERIUM***

*Feoktistova N. A., Lydina M. A., Petrukova N. A., Vasilyev D. A.,  
Aleshkin A.V., Shvidenko I.G.*

**Keywords:** *Bacillus megaterium, bacteriophages, reaction of increase of a caption of a phage, parameters, milk, milk-containing products*

*Results of researches on selection of parameters of statement of reaction of increase of a caption of a phage for development of the scheme of the accelerated bioindication of bacteria of *Bacillus megaterium* in the milk and milk-containing products which are the reason of their damage are presented in article. Results of experiment testify that 28 hours are an optimum time parameter of statement (RNF) for detection of bacteria of *Bacillus megaterium* with application of a phage of Bm-6 UGSHA.*